

- Kondo T. Prognostic significance of promyelocytic leukemia expression in gastrointestinal stromal tumor; integrated proteomic and transcriptomic analysis. *Cancer Sci.* 2014 Dec 2. doi: 10.1111/cas.12565.
49. Taoka M, Morofuji N, Yamauchi Y, Ojima H, Kubota D, Terukina G, Nobe Y, Nakayama H, Takahashi N, Kosuge T, Isobe T, Kondo T. Global PROTOMAP Profiling to Search for Biomarkers of Early-Recurrent Hepatocellular Carcinoma. *J Proteome Res.* 2014 Nov 7;13(11):4847-58. doi: 10.1021/pr500262p.
50. Hosoya N, Sakumoto M, Tomita Y, Kondo T. Approach to spot overlapping problem in 2D-PAGE revealed clinical and functional signature of RKIP and MnSOD in renal cell. *EuPA Open Proteomics.* 2014. 4;129-139.
51. Kubota D, Yoshida A, Kawai A, Kondo T. Proteomics identified overexpression of SET oncogene product and possible therapeutic utility of protein phosphatase 2A in alveolar soft part sarcoma. *J Proteome Res.* 2014 May 2;13(5):2250-61. doi: 10.1021/pr400929h.
52. Mimae T, Ito A, Hagiwara M, Nakanishi J, Hosokawa Y, Okada M, Murakami Y, Kondo T. A novel approach to pseudopodia proteomics: excimer laser etching, two-dimensional difference gel electrophoresis, and confocal imaging. *Protoc exch.* 2014 Mar 4;2014. pii: 2014.007.
53. Ichikawa H, Kanda T, Kosugi S, Kawachi Y, Wakai T, Kondo T. Proteomic and meta-transcriptomic study on lymph node metastasis in gastric cancer. *EuPA Open Proteomics.* 2014;3:183-94.
2. 学会発表
1. 川井 章:骨盤腫瘍手術-解剖学的アプローチ, 2014年2月1日, 第1回日本骨盤手術手技研究会
 2. 川井 章:Ewing Sarcoma(ESFT), 2014年4月17-19日, 8th SIOP Asia Congress
 3. 川井 章:骨盤腫瘍の診断と治療 2014年5月10日 第20回倉敷駅前会
 4. 川井 章:骨盤腫瘍の診断と治療 2014年6月7日 第6回自由が丘整形医会
 5. 川井 章:肉腫(サルコーマ) 2014年8月9日 AKIBA Cancer Forum 2014サルコーマ) 2014年8
 6. 川井 章:骨・軟部腫瘍(肉腫)2014年8月28-30日 第52回日本癌治療学会学術集会
 7. 川井 章:骨腫瘍の診断と治療 2014年9月19-20日第63回東日本整形災害外科学会
 8. 小林和善:SWI/SNF複合体の触媒サブユニット Brm と miR-199a が上皮がん細胞株において形成する遺伝子発現制御ネットワークとその生物学的機能。第37回日本分子生物学会年会 横浜 2014年11月26日
 9. Kondo, M., Haraguchi, T. and Iba, H. Analysis on the molecular mechanisms of EMT using new TuD RNA expression lentivirus vectors regulating miR-200c expression. (ポスター) 第37回日本分子生物学会年会 横浜 2014年11月26日
 10. Haraguchi, T., Kondo, M. and Iba, H. Analysis on EMT using Tetracycline-inducible microRNA inhibitory vectors against miR-200c. 第73回日本癌学会学術総会 横浜 2014年9月25日

11. Kobayashi, K., Sakurai, K., Hiramatsu, H., Haraguchi, T., Inada, K. and Iba, H. The regulatory networks formed by Brm subunit of SWI/SNF and miR-199a and its biological function. 第 73 回日本癌学会学術総会 横浜 2014 年 9 月 25 日
12. Iba, H., Kobayashi, K., Sakurai, K., Hiramatsu, H., and Haraguchi, T. Robust gene regulatory networks that support anchorage-independent growth of human epithelial tumor cell lines. 第 73 回日本癌学会学術総会 横浜 2014 年 9 月 25 日
13. 伊庭英夫, 原口健: 分子スイッチとしての miRNA と TuD RNA 発現ベクターによるその活性抑制 miRNA as a molecular switch and inhibition of miRNA function by vectors expressing TuD RNA. 第 6 回日本 RNAi 研究会 広島 2014 年 8 月 29 日 (シンポジウム)
14. Ochiya T. 「Direct Detection Of Extracellular Vesicles In Human Serum By ExoScreen System」. Expectations of the first meeting of International Society for Extracellular Vesicles, ISEV 2013, Boston, USA. April 15-21
15. Ochiya T. 「Exosomes as a Novel Diagnostic and Therapeutic Tool for Cancer」. World CTC, Berlin, Germany. April 23-27, 2013
16. 「がん転移を制御する新規標的因子: エクソソームの性状解析と治療戦略」、落谷孝広、第 18 回癌と遺伝子・大分外科フォーラム(2013.6.4 大分)
17. 「Functional Imaging of Cancer-Specific Exosomes In Tumor Metastasis」、落谷孝広、19th 日本遺伝子治療学会 (2013.7.3 岡山)
18. 「遺伝子導入技術に基づく分子イメージング」、落谷孝広、29th 日本 DDS 学会学術集会 (2013.7.4-5 京都)
19. 「分子がん転移研究の新たな潮流: エクソソームによる前転移ニッシュの実態解明」、落谷孝広、22th 日本がん転移学会学術集会・総会 (2013.7.10-12 長野)
20. 「「Exosome による遺伝情報の水平伝達の発見がもたらすインパクト」、落谷孝広、第 5 回 ライフサイエンスセミナー (2013.7.17 東京)
21. 「「エクソソームによるがんの浸潤転移の解明と Liquid Biopsy への応用」、落谷孝広、第 10 回 日本病理学会カンファレンス 2013 六甲山、(2013.8.2 神戸)
22. 「細胞間コミュニケーションの新たな担い手「エクソソーム」の正体と診断治療への応用」、落谷孝広、34th 日本炎症・再生医学会、(2013.7.2 京都)
23. 「Exosome による遺伝情報の水平伝達と疾病診断治療治療への応用」、落谷孝広、29th 日本 DDS 学会、(2013.7.4 京都)
24. 「エクソソームの基礎と最新の話題」、落谷孝広、京都大学再生医科学研究所・講演 (2013.8.8-9 京都)
25. 「がん微小環境エクソソームと腫瘍血管新生」、落谷孝広、第 21 回日本血管生物医学会学術集会 (2013.9.26-28 大阪)
26. 「エクソソーム診断の可能性と展望」、落谷孝広、第 33 回日本分子腫瘍マーカー研究会 (2013.10.2 横浜)
27. 「体液中の細胞外分泌顆粒による新規がんバイオマーカーの開発」、落谷孝広、第 33 回日本分子腫瘍マーカー研究会 (2013.10.3-5 横浜)
28. 「Exosomes/microRNA-mediated cancer metastasis: A novel approach for cancer diagnosis and treatment」、落谷孝広、75th 日本血液学会学術集会 (2013.10.10-13 札幌)
29. 分泌型 miRNA/エクソソームによる疾患の診断・治療、落谷孝広、55th 日本神経学会学術大会 (2014.5.20-22 福岡)
30. エクソソームによる新しいシグナル伝達機構の解明、落谷孝広、第 79 回 日本インターフェロン・サイトカイン学会学術 (2014.6.18-20 北海道)

- (2014.9.24 横浜)
32. がんの代謝を制御する細胞外分泌顆粒の解析、落谷孝広、第 87 回 日本生化学会大会 (2014.10.15-18 京都)
 33. 「体液中の細胞外分泌顆粒による新規がんバイオマーカーの開発」、落谷孝広、第 146 回 日本医学会総会シンポジウム (2014.12.18 東京)
 34. Ochiya T. 「ExoScreen provides a new diagnostic tool for circulating exosomes」. ISEV Exosome 2014, Australia.Melbourne. February 2-6, 2014
 35. Ochiya T. 「Role of miRNAs in the pathogenesis of liver disease」. APASL2014, Australia.Brisbane. March 12-17, 2014
 36. 骨肉腫患者治療後の長期的問題点 武田 健, 国定 俊之, 長谷井 嬢, 上原 健敬, 大森 敏規, 尾崎 敏文. 第 88 回日本整形外科学会学術総会. (2014/5/22-25)神戸・神戸国際会議場
 37. AYA 世代の進行期肉腫の治療戦略 進行期骨肉腫 AYA 患者に対する緩和ケアチームの早期介入. 国定 俊之, 武田 健, 松岡 順治, 尾崎 敏文 第 27 回日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会 (2014/7/17-18)大阪・大阪国際会議場
 38. がん治療の個別化における形成外科の役割、期待と現状 骨軟部悪性腫瘍の治療 診断・切除・再建. 尾崎 敏文, 国定 俊之, 武田 健, 藤原 智洋, 長谷川 健二郎, 木股 敬裕. 第 52 回日本癌治療学会 (2014/8/28-30)横浜・パシフィコ横浜
 39. 尾崎 充彦, 平畑美緒, 伊藤真保, 神田裕介, 落谷孝広, 押村光雄, 井藤久雄, 岡田 太:ヒト骨肉腫細胞の肺転移を抑制する miRNA-143 が制御する標的遺伝子群からみた転移促進因子の検索 第 103 回日本病理学会総会、2014 年 4 月 24-26 日、広島
 40. 平畑美緒, 尾崎 充彦, 岡田 太:PAI-1 は骨肉腫細胞の浸潤・転移に促進性に作用する 第 23 回日本がん転移学会学術集会、2014 年 7 月 10-11 日、金沢
 41. 平畑美緒, 神田裕介, 尾崎 充彦, 岡田太:PAI-1 はヒト骨肉腫細胞肺転移を抑制するための標的分子となりうる 第 6 回日本 RNAi 研究会、2014 年 8 月 28-30 日、広島
 42. 平畑美緒, 尾崎 充彦, 神田裕介, 落谷孝広, 井藤久雄, 岡田 太:PAI-1 ノックダウンはヒト骨肉腫細胞の浸潤・転移を抑制する 第 73 回日本癌学会学術総会、2014 年 9 月 25-27 日、横浜
 43. 平畑美緒, 尾崎 充彦, 神田裕介, 岡田太:PAI-1 はヒト骨肉腫細胞肺転移を抑制する標的となりうる 第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 25-27 日、横浜
 44. Fujiwara T, Katsuda T, Kosaka N, Kawai A, Ozaki T, Ochiya T. Exosome-mediated lung metastasis formation in osteosarcoma progression. Orthopaedic Research Society, New Orleans, 2014
 45. Tomohiro Fujiwara, Yutaka Nezu, Toshiyuki Kunisada, Ken Takeda, Toshinori Omori, Akira Kawai, Takahiro Ochiya, Toshifumi Ozaki. RPN2 GENE REGULATES MALIGNANT PHENOTYPES OF OSTEOSARCOMA. Connective Tissue Oncology Society, Berlin, Annual Meeting Final Program, p.58, 2014
 46. 藤原智洋 川井 章 小林英介 丹沢義一 中馬広一. 初回診断から 17 年後に非典型的肺転移像をきたした低悪性度中心型骨肉腫の 1 例. 中部日本整形災害外科学会雑誌, Vol. 57, 春期学会号, p.155. 第 122 回中部日本整形災害外科学会学術総会, 岡山, 2014 年 4 月
 47. 藤原智洋 川井 章 小倉浩一 窪田大介 薛 宇孝 小林英介 丹沢義一 中谷文彦 中馬広一. 過去 30 年の骨盤悪性骨腫瘍の治療成績. 日本整形外科学会雑誌, Vol.88, No.3, S667. 第 87 回日本整形外科学会学術総会, 神戸, 2014 年 5 月

48. 藤原智洋, 国定俊之, 武田 健, 山川 泰明, 上原健敬, 大森敏則, 魚谷弘二, 杉生和久, 柳井広之, 尾崎敏文. 右尺骨遠位骨端部骨腫瘍の1例. 第138回関西骨軟部研究会, 大阪, 2014年6月
49. 藤原智洋 根津 悠 川井 章 尾崎敏文 落谷孝広.
骨肉腫における ribophorin II (RPN2) の機能解析. 日本整形外科学会雑誌, Vol.88, No.6, S1172. 第47回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会、大阪、2014年7月
50. 藤原智洋、国定俊之、武田 健、尾崎敏文
仙骨発生骨巨細胞腫の治療成績. 第123回中部日本整形災害外科学会学術総会, 名古屋, 2014年10月. 中部日本整形災害外科学会雑誌, Vol. 57, 秋期学会号, p.248
51. 藤原智洋 国定俊之 武田 健 魚谷弘二 杉生和久 根津 悠 川井 章 落谷孝広 尾崎敏文. ribophorin II (RPN2) は骨肉腫の化学療法感受性及び浸潤能を制御する. 日本整形外科学会雑誌, Vol.88, No.8, S1362. 第29回日本整形外科学会基礎学術集会、鹿児島、2014年10月
52. 近藤格 プロテオーム解析による肉腫のバイオマーカーの開発 2014年4月5日
53. 近藤格 プロテオーム解析によるバイオマーカー開発の常識を疑う 第12回日本プロテオーム学会 シンポジウム 2014年7月17-18日 つくば国際会議場
54. Tadashi Kondo, Akira Kawai. PROTEOMICS TOWARD PERSONALIZED TREATMENT OF SARCOMA. Siena Meeting, 2014年8月31日-9月4日 Siena, Italy.
55. Daisuke Kubota, Akihiko Yoshida, Akira Kawai, Tadashi Kondo. Proteomics identified overexpression of SET oncogene product and possible therapeutic utility of protein phosphatase 2A in alveolar soft part sarcoma. 13th Annual Meeting of Human Proteome Organization. 2014年10月5-8日、Madrid, Spain.
56. Tadashi Kondo, Biomarker development for sarcoma toward personalized medicine. 19th World Congress on Advances in Oncology and 17th International Symposium on Molecular Medicine 2014年10月9-11日, Athens, Greece
57. 近藤格 蛍光二次元電気泳動法を用いたがんのバイオマーカー開発 第65回日本電気泳動学会総会 2014年24-25日
58. Tadashi Kondo, Translational Research of Sarcomas. 第1回国際がん研究シンポジウム、2015年2月12-13日
- G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
 - 1) 国際特許出願 PCT/IB2012/002626、MICRORNA-BASED METHODS AND ASSAYS FOR OSTEOSARCOMA, 2012.9.7
日本移行 2014.3.6 (審査中)
米国移行 2014.4.9 (審査中)
欧州移行 2014.6.18 (審査中)
 2. 実用新案登録
特になし。
 3. その他
特になし

II. 分担研究報告

S-TuD 製剤の大量合成法の最適化及び予備安定性試験

研究分担者 川井 章 国立がん研究センター中央病院骨軟部腫瘍科

研究要旨

日本発の新規 microRNA 阻害剤である S-TuD の創薬開発を進めるため、ジーンデザイン社と協同で、S-TuD の大量合成法の最適化プロトコールを作成した。

S-TuD を大量合成するためには、従来の合成法で困難とされる長鎖 1 本鎖 RNA 大量合成方法の最適化、2 本鎖化方法の最適化、さらには医薬品開発に必須である規格試験の確立が必要である。前年度検討した 2'-O-メチル化修飾された長鎖 1 本鎖 RNA の大量合成方法のさらなる最適化を検討した。この結果、これまでよりも少ない精製回数で効率的に合成品を得ることに成功した。この結果、生産効率が大幅に改良され S-TuD の治験薬製造が可能となる状況を達成した。さらにまた医薬品開発に必要となる安定性試験についても実施し、治験薬製造が可能となる状況を達成した。

A. 研究背景、目的
(背景)

日本発の新規 miRNA 阻害剤である S-TuD は 2'-O-メチル化修飾された長鎖 1 本鎖 RNA 同士が、両端に相補鎖を形成し中央部に非相同領域を配位するユニークな 2 本鎖構造を有する。2'-O-メチル化 RNA の構造を図 1 に、S-TuD の構造を図 2 に示す。

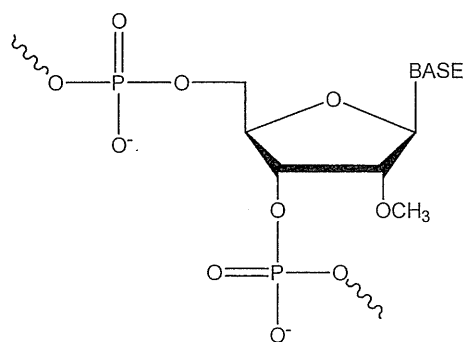


図1. 2'-O-メチル化RNAの構造

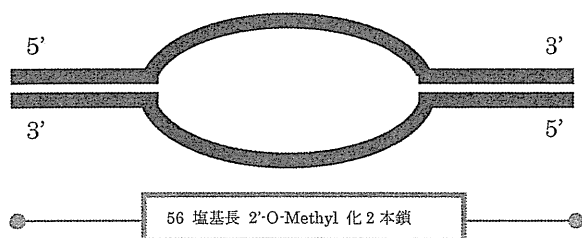


図2. S-TuDの構造

この構造体の大量合成を実用化するため

には、従来の合成法で困難とされる長鎖 1 本鎖 RNA 大量合成方法の最適化、2 本鎖化方法の最適化、さらには医薬品開発に必須である規格試験の確立が必要である。そこでジーンデザイン社と協同し、治験薬製造まで対応可能な大量合成プロトコールの最適化を実施した。また医薬品開発として必須となる予備的な安定性試験も実施した。

B. 研究方法

2'-O-メチル化修飾された長鎖 1 本鎖 RNA の大量合成方法の検討を行った。得られた最適条件を基にグラムスケールが製造可能な固相合成システムを用い、いくつかの異なる S-TuD に対して数百ミリグラム以上の合成を実施した。

併せて治験薬としての安定性を評価する為、S-TuD 凍結乾燥品の予備的な長期安定性試験(1年間)を行い、各ポイントでの物性試験を実施した。

(倫理面への配慮)

本研究においては動物実験およびヒト検体を用いた解析を行っておらず、倫理審査対象とはなっていない。

C. 研究結果

2'-O-メチル化修飾された長鎖 1 本鎖 RNA の大量合成方法の課題として、合成、精製、2 本鎖化の最適化が必要だったが、今回検討を行った結果、現在までに 1 本鎖部分の合成

については初期製法から約3倍の高収率で目的産物得られ、精製方法の単純化と2本鎖化の最適化を達成した。具体的には、合成方法が改善された結果、合成時に生じる不純物は大幅に減少し、前年度の製造状況では精製が3回は必要だったところ、各1本鎖共、陰イオンクロマトグラフィーの精製のみで望ましい純度が確保できることをS-TuD-NC21nt-1の合成に際して確認した。合成後の粗合成分析を示したHPLCの結果を図3及び図4に示す。図3は前年度に製造したS-TuD133-a-pfのアンチセンス粗合成品のHPLC分析結果で、図4は本年度製造した同配列の粗合成品のHPLC分析の結果を示している。最も高いピークが目的産物であり、それ以外の副生成物ピークの大幅な減少が確認できる。

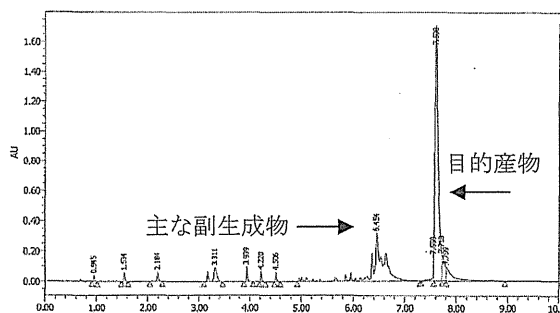


図3.前年度(平成25年度)の合成状況(合成後のHPLC分析結果):目的産物51.9%

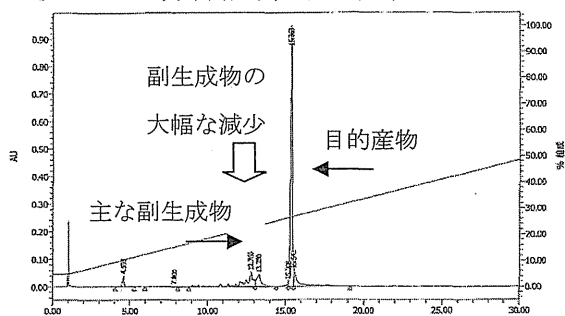


図4.本年度(平成26年度)の合成状況(合成後のHPLC分析結果):目的産物65.2%

これらの製造工程が改善した結果の比較を前年度分として図5に、本年分を図6に示す。主に精製の工程が短縮され、治験薬の実製造に適した各工程の最適化と単純化が達成された。

予備的な安定性試験に関しては、1本鎖部分の不純物の定量的解析と配列解析、2本鎖純度検定を実施した。

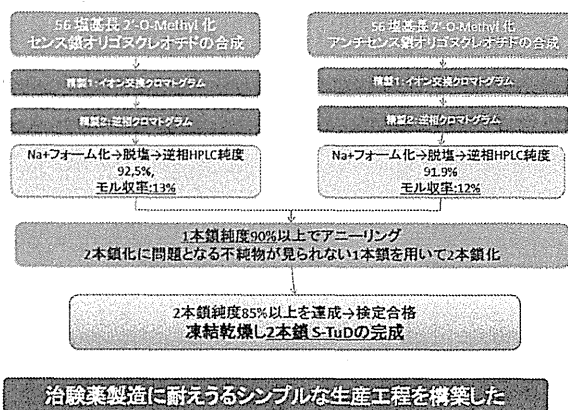


図5.前年度(平成25年度)製造状況

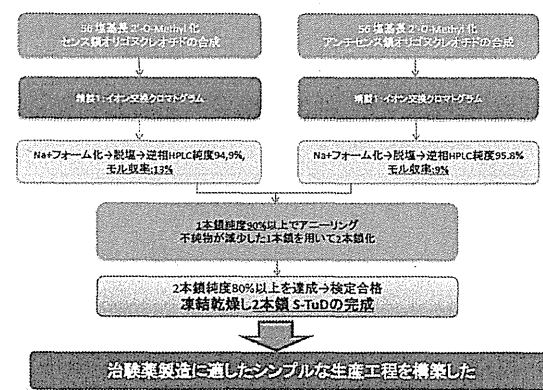


図6.本年度(平成26年度)製造状況

S-TuDの安定性試験はこれまで実施された実績がなかったが、凍結乾燥状態での1年間の安定性試験を実施した。温度は-20℃及び5℃の2つの温度設定で実施した。また試験は質量分析、吸光度試験、二本鎖の純度試験及びエンドキシン検定を各時点で測定し、物性及び生物学的な変化の有無を確認した。

その結果、2つの温度設定の各期間において規格設定値を超える変化は確認できなかった。このため、S-TuD凍結乾燥品の保管温度は冷凍保存だけでなく、冷蔵保存が可能であることが示された。このことは治験を実施する上で、治験薬の取り扱い上有利と考えられる。

行なった試験内容と時期及び各結果について表1に示す。

表 1. 試験項目

規格		0ヶ月の平均値 (n=3) ± 10% (温度: -20°C ± 5°C 保存)				0ヶ月の平均値 (n=3) ± 10% 温度: 5°C ± 3°C 保存)			
保存期間 (月)		0	3	6	12	0	3	6	12
吸光度測定試験	平均値	36.6	36.4	35.9	34.4	36.6	35.3	35.8	34.2
	偏差	100%	99.50%	98.10%	94.00%	100%	96.40%	97.80%	93.40%
純度試験結果 (面積%: 類縁物質 < 20%)	平均値	13.1	13.5	13.9	13.3	13.1	14.0	14.3	13.5

D. 考察

2'-O-メチル化修飾された長鎖1本鎖RNAの合成に関しては収率が大幅に改善されたため、合成時に副生成物として生成される不純物が大幅に低減され、その結果、精製回数を少なくすることができた。予備的な安定性試験を実施し、-20°C及び5°Cで二本鎖の凍結乾燥品は安定であることを確認した。これらのことから治験薬製造開始が可能な状況を達成できたと考えられる。

E. 結論

本研究では、S-TuD 大量合成プロトコールの最適化を行った。その結果、2'-O-メチル化修飾された長鎖1本鎖RNAの合成に関しては収率が大幅に改善され、最適化を行うことができた。予備的な安定性試験の結果、-20°C及び5°Cの条件で1年間物性試験を行った結果、安定であることが確認できた。前年度の規格試験の実施を可能な状況と合わせ治験薬の製造が可能な状況が達成できたと考えられる。

本研究の結果により、日本発の miRNA 阻害剤 S-TuD の治験薬製造を開始できる状況を達成した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Clinical relevance and therapeutic significance of microRNA-133a expression profiles and functions in malignant osteosarcoma-initiating cells. Fujiwara T, Katsuda T, Hagiwara K, Kosaka N, Yoshioka Y, Takahashi RU, Takeshita F, Kubota D, Kondo T, Ichikawa H, Yoshida A, Kobayashi E, Kawai A, Ozaki T, Ochiya T. *Stem Cells*. 2014 Apr;32(4):959-73.
2. Phase I and pharmacokinetic study of trabectedin, a DNA minor groove binder, administered as a 24-h continuous infusion in Japanese patients with soft tissue sarcoma. Ueda T, Kakunaga S, Ando M, Yonemori K, Sugiura H, Yamada K, Kawai A. *Invest New Drugs*. 2014 Apr 3.
3. STAT6 immunohistochemistry is helpful in the diagnosis of solitary fibrous tumors. Yoshida A, Tsuta K, Ohno M, Yoshida M, Narita Y, Kawai A, Asamura H, Kushima R. *Am J Surg Pathol*. 2014 Apr;38(4):552-9.
4. Proteomics Identified Overexpression of SET Oncogene Product and Possible Therapeutic Utility of Protein Phosphatase 2A in Alveolar Soft Part Sarcoma. Kubota D, Yoshida A, Kawai A, Kondo T. *J Proteome Res*. 2014 Mar 31.
5. International expert opinion on patient-tailored management of soft tissue sarcomas. Blay JY, Sleijfer S, Schöffski P, Kawai A, Brodowicz T, Demetri GD, Maki RG. *Eur J Cancer*. 2014 Mar;50(4):679-89.
6. Immediate soft-tissue reconstruction using a rectus abdominis myocutaneous flap following wide resection of malignant bone tumours of the pelvis. Ogura K, Miyamoto S, Sakuraba M, Chuman H, Fujiwara T, Kawai A. *Bone Joint J*. 2014 Feb;96-B(2):270-3.
7. MicroRNA expression and functional profiles of osteosarcoma. Kobayashi E, Satow R, Ono M, Masuda M, Honda K, Sakuma T, Kawai A, Morioka H, Toyama Y, Yamada T. *Oncology*. 2014;86(2):94-103.
8. Clinical outcomes of Kyocera Modular Limb Salvage system after resection of bone sarcoma of the distal part of the femur: the Japanese Musculoskeletal Oncology Group study. Nakamura T, Matsumine A, Uchida A, Kawai A, Nishida Y, Kunisada T, Araki N, Sugiura H, Tomita M, Yokouchi M, Ueda T, Sudo A. *Int Orthop*. 2014 Apr;38(4):825-30.
9. Favorable outcome after complete resection in elderly soft tissue sarcoma patients: Japanese Musculoskeletal Oncology Group study. Yoneda Y, Kunisada T, Naka N, Nishida Y, Kawai A, Morii T, Takeda K, Hasei J, Yamakawa Y, Ozaki T; Japanese Musculoskeletal Oncology Group. *Eur J Surg Oncol*. 2014 Jan;40(1):49-54.
10. Prognostic factors in elderly osteosarcoma patients: a multi-institutional retrospective study of 86 cases. Iwata S, Ishii T, Kawai A, Hiruma T, Yonemoto T, Kamoda H, Asano N, Takeyama M. *Ann Surg Oncol*. 2014 Jan;21(1):263-8.

11. SS18-SSX fusion protein-induced Wnt/ β -catenin signaling is a therapeutic target in synovial sarcoma. Trautmann M, Sievers E, Aretz S, Kindler D, Michels S, Friedrichs N, Renner M, Kirfel J, Steiner S, Huss S, Koch A, Penzel R, Larsson O, Kawai A. *Oncogene*. 2014 Oct 16;33(42):5006-16.
12. Clinicopathologic analysis of spindle cell/sclerosing rhabdomyosarcoma. Yasui N, Yoshida A, Kawamoto H, Yonemori K, Hosono A, Kawai A. *Pediatr Blood Cancer*. 2014 Dec 31.
13. Reversible hair depigmentation in a Japanese female treated with pazopanib. Kobayashi E, Koyama T, Kobayashi K, Setsu N, Kawashima M, Kawai A. *J Dermatol*. 2014 Nov;41(11):1021-2.
14. Chronic expanding hematoma with a significantly high fluorodeoxyglucose uptake on ^{18}F -fluorodeoxyglucose positron emission tomography, mimicking a malignant soft tissue tumor: a case report. Nishida Y, Kobayashi E, Kubota D, Setsu N, Ogura K, Tanzawa Y, Nakatani F, Kato Y, Chuman H, Kawai A. *J Med Case Rep*. 2014 Oct 21;8:349.
15. Early Mobilization after Free-flap Transfer to the Lower Extremities: Preferential Use of Flow-through Anastomosis. Miyamoto S, Kayano S, Fujiki M, Chuman H, Kawai A, Sakuraba M. *Plast Reconstr Surg Glob Open*. 2014 Apr 7;2(3):e127.
16. RPN2 Gene Confers Osteosarcoma Cell Malignant Phenotypes and Determines Clinical Prognosis. Fujiwara T, Takahashi RU, Kosaka N, Nezu Y, Kawai A, Ozaki T, Ochiya T. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2014 Sep 2;3:e189.
17. Global protein-expression profiling for reclassification of malignant fibrous histiocytoma. Kikuta K, Morioka H, Kawai A, Kondo T. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Aug 28.
18. An analysis of factors related to the tail-like pattern of myxofibrosarcoma seen on MRI. Kikuta K, Kubota D, Yoshida A, Morioka H, Toyama Y, Chuuman H, Kawai A. *Skeletal Radiol*. 2015 Jan;44(1):55-62
19. Multiple metastases from histologically benign intraarticular diffuse-type tenosynovial giant cell tumor: a case report. Asano N, Yoshida A, Kobayashi E, Yamaguchi T, Kawai A. *Hum Pathol*. 2014 Nov;45(11):2355-8.
20. Unique mutation portraits and frequent COL2A1 gene alteration in chondrosarcoma. Totoki Y, Yoshida A, Hosoda F, Nakamura H, Hama N, Ogura K, Yoshida A, Fujiwara T, Arai Y, Toguchida J, Tsuda H, Miyano S, Kawai A, Shibata T. *Genome Res*. 2014 Sep;24(9):1411-20.
21. The prognosis of osteosarcoma occurring as second malignancy of childhood cancers may be favorable: experience of two cancer centers in Japan. Yonemoto T, Hosono A, Iwata S, Kamoda H, Hagiwara Y, Fujiwara T, Kawai A, Ishii T. *Int J Clin Oncol*. 2014 Jul 15.
22. Factors that influence functional outcome after total or subtotal scapulectomy: Japanese Musculoskeletal

- Oncology Group (JMOG) study.
Hayashi K, Iwata S, Ogose A, Kawai A,
Ueda T, Otsuka T, Tsuchiya H.
PLoS One. 2014 Jun 17;9(6)
23. A randomized phase II/III trial of perioperative chemotherapy with adriamycin plus ifosfamide versus gemcitabine plus docetaxel for high-grade soft tissue sarcoma: Japan Clinical Oncology Group Study JCOG1306.
Kataoka K, Tanaka K, Mizusawa J, Kimura A, Hiraga H, Kawai A, Matsunobu T, Matsumine A, Araki N, Oda Y, Fukuda H, Iwamoto Y; Bone and Soft Tissue Tumor Study Group of the Japan Clinical Oncology Group.
Jpn J Clin Oncol. 2014 Aug;44(8):765-9.
24. Differential SALL4 immunoexpression in malignant rhabdoid tumours and epithelioid sarcomas.
Yoshida A, Asano N, Kawai A, Kawamoto H, Nakazawa A, Kishimoto H, Kushima R.
Histopathology. 2015 Jan;66(2):252-61
25. Prognostic significance of promyelocytic leukemia expression in gastrointestinal stromal tumor; integrated proteomic and transcriptomic analysis.
Ichikawa H, Yoshida A, Kanda T, Kosugi S, Ishikawa T, Hanyu T, Taguchi T, Sakumoto M, Katai H, Kawai A, Wakai T, Kondo T.
Cancer Sci. 2015 Jan;106(1):115-124.
2. 学会発表
1. 川井 章:骨盤腫瘍手術-解剖学的アプローチ, 2014年2月1日, 第1回日本骨盤手術手技研究会
 2. 川井 章:Ewing Sarcoma(ESFT), 2014年4月17-19日, 8th SIOP Asia Congress
 3. 川井 章:骨盤腫瘍の診断と治療
- 2014年5月10日 第20回倉敷駅前会
4. 川井 章:骨盤腫瘍の診断と治療 2014年6月7日 第6回自由が丘整形医会
 5. 川井 章:肉腫(サルコーマ) 2014年8月9日 AKIBA Cancer Forum 2014(サルコーマ) 2014年8
 6. 川井 章:骨・軟部腫瘍(肉腫)2014年8月28-30日 第52回日本癌治療学会学術集会
 7. 川井 章:骨腫瘍の診断と治療 2014年9月19-20日第63回東日本整形災害外科学会

研究要旨

我々は特定の miRNA を高い効率で阻害する RNA decoy 分子である S-TuD (synthetic TuD) を開発し、これが既存の miRNA 阻害剤をはるかに凌ぐ阻害効率であることを示すと共にその基本構造の設計法をすでに公表して日本・米国・中国での特許を取得している。骨肉腫制圧のためにその阻害効率を上昇させるために、24 年度までに S-TuD の基本分子構造に関する諸パラメーターの最適化を終えている。本年度は、薬物動態を解析するために real-time RT-PCR 法を用いた、S-TuD の超微量検出法の開発を行なって、これを確立した。また種々の S-TuD の導入が培養細胞内の interferon を惹起して、その標的遺伝子を活性化するか否かについて検討し、こうした免疫反応を一切誘導しないことが示された。また、S-TuD の血清中での安定性の評価を行ない、マウス血清や、ヒト血清内で極めて安定であることが確認された。

A. 研究背景、目的 (背景)

特定の miRNA を阻害する技術は、研究ツールとしてだけではなく、miRNA を標的とした治療の基本技術として必須となってきた。これまでに我々は特定の miRNA の配列を認識してその活性を阻害する Decoy RNA (TuD RNA; Tough Decoy RNA) を設計し、これを RNA polymerase III により高レベル発現させるユニットを搭載したプラスミドベクターやレトロレンチウイルスベクターを開発してきた。TuD RNA は特徴的な二次構造を有していて、従来のデコイ RNA に比べて著しく高い阻害効果を発揮することから、miRNA を対象とした基礎研究において有用なツールとして miRNA の標的の決定、発癌活性の検定をはじめとした幅広い分野で広く使用されている。しかし TuD RNA 発現ウイルスベクターを治療に直接使用するためには、遺伝子治療の必要があるが、残念なことにはまだ課題が多いのが現状である。そこで我々はこの基盤技術の核酸医薬化を目指して、2本の 2'-OME RNA 核酸オリゴで構成される分子を合成しアニールすることにより、TuD RNA の二次構造を模した、S-TuD (Synthetic TuD) と呼ぶ分子を作製した。そして 3 種の miRNA に対する S-TuD について阻害効率の高い共通した設計法を開発して公表している (Haraguchi T ,

et al: Nucleic Acids Res 40:e58 2012)。また TuD と S-TuD の基本構造とその miRNA の阻害活性については日本 (登録番号第 4936343 号) 米国 (8,563,709) 中国 (ZL200980152926, X 号) の特許を取得している。

B. 研究方法

(1) S-TuD の超微量検出法の開発

精製された S-TuD122 標品 (全て 2'-O-Methyl 化されている) を用いて、MBS (miRNA binding site) と Stem II 領域に対する primer を設計し、これを逆転写酵素により伸長させ得られた cDNA を real-time PCR により増幅、定量する系を数種考案した。

(2) S-TuD の免疫反応誘導性の検討

HCT-116 細胞に 10nM S-TuD を transfection 法で導入し、7 ないし 24 時間後に Total mRNA を回収した。そして Interferon の標的遺伝子群である内在性の *OAS-1*, *OAS-2*, *MXI*, *IRF-9*, *IFITM-1* mRNA の発現量を real-time PCR 法で検定した。

(3) S-TuD の血清中での安定性の評価

各種 S-TuD をマウスまたはヒト血清と混合後 37°C で一定時間保温後、液体 N₂ 中で凍結した。各検品は、核酸分解酵素のない H₂O で 100 倍希釈後直ちに、20% TBE native polyacryl amiole gel により 200V で電機泳動した。ゲルは SyBR Gold (Invitrogen) により染

色し、Wise UV (WUV-M20)で検出した。

(倫理面への配慮)

本研究では、動物実験や病理検体等を用いた実験は含まれなかった。

C. 研究結果

(1) S-TuD の超微量検出法の開発

これまでに miR-122RNA を標的とする S-TuD122 を材料系に選び、S-TuD122 に特異的な primer を用いて半定量的 RT-PCR さらには、real-time RT-PCR による超微量検出法の開発に成功し、検量線の解析から fM の精製標品の検量線の濃度まで検出できる系が作成できた。現在 S-TuD の種類によらず使用できる Stem II 領域に対する universal primer set を使用して、ほぼ同程度の感度で検出する系も確立した。

(2) S-TuD の免疫反応誘導性の検討

種々の S-TuD (10nM) や positive control としての Poly (I: C) (100ng/ml) を HCT116 細胞に transfection 後7ないし24時間後に RNA を抽出して、各内在性遺伝子 mRNA 量を定量的 PCR で定量した。その結果、S-TuD を transfection した細胞は、いずれの Interferon 応答遺伝子群の誘導をしないことが示された。

(3) S-TuD の血清中での安定性の評価

S-TuD をマウス血清や、ヒト血清内に添加して 37°C で保温して解析したところ、3 日以上にわたってほぼ消化されることなく血中で安定に存在することが確認された。

D. 考察

本年度の研究目標であった 1)-3) は、ほぼ予定通り達成された。

E. 結論

2), 3) の結果から、S-TuD に免疫反応の誘導性は、ほとんどないこと、またおそらく Stem I, II の存在により、S-TuD の血中での安定性も極めて高いことが判明し、医薬品としての重要な検査項目が、ほぼ clear できたと考える。1) の超微量分析法により、今後任意の miRNA に対する S-TuD の定量が可能となりマウスを用いた薬物動態の解析が可能となったと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Mizutani, T., Ishizaka, A., Suzuki, Y., and Iba, H. 7SK small nuclear ribonucleoprotein complex is recruited to the HIV-1 promoter via short viral transcripts. *FEBS Letters*, 588:1630-1636 (2014) PMID 24607481

Kobayashi, K., Sakurai, K., Hiramatsu, H., Inada, K., Shiogama, K., Nakamura, S., Suemasa, F., Kobayashi, K., Imoto, S., Haraguchi, T., Ito, H., Ishizaka, A., Tsutsumi, Y., & Iba H. The miR-199a/Brm/EGR1 axis is a determinant of anchorage-independent growth in epithelial tumor cell lines. *Scientific Reports*, in press.

2. 学会発表

小林和善: SWI/SNF 複合体の触媒サブユニット Brm と miR-199a が上皮がん細胞株において形成する遺伝子発現制御ネットワークとその生物学的機能。第 37 回日本分子生物学会年会 横浜 2014 年 11 月 26 日

Kondo, M., Haraguchi, T. and Iba, H. Analysis on the molecular mechanisms of EMT using new TuD RNA expression lentivirus vectors regulating miR-200c expression. (ポスター) 第 37 回日本分子生物学会年会 横浜 2014 年 11 月 26 日

Haraguchi, T., Kondo, M. and Iba, H. Analysis on EMT using Tetracycline-inducible microRNA inhibitory vectors against miR-200c. 第 73 回日本癌学会学術総会 横浜 2014 年 9 月 25 日

Kobayashi, K., Sakurai, K., Hiramatsu, H., Haraguchi, T., Inada, K. and Iba, H. The regulatory networks formed by Brm subunit of SWI/SNF and miR-199a and its biological function. 第 73 回日本癌学会学術総会 横浜 2014 年 9 月 25 日

Iba, H., Kobayashi, K., Sakurai, K., Hiramatsu, H., and Haraguchi, T. Robust gene regulatory networks that support anchorage-independent growth of human epithelial tumor cell lines. 第 73 回日本癌学会学術総会 横浜 2014 年 9 月 25 日

伊庭英夫、原口健: 分子スイッチとしての

miRNAとTuD RNA 発現ベクターによるその
活性抑制 miRNA as a molecular switch and
inhibition of miRNA function by vectors
expressing TuD RNA. 第6回日本RNAi研
究会 広島 2014年8月29日(シンポジウム)

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

特こなし。

2. 実用新案登録

特こなし。

3. その他

特こなし。

microRNA 阻害剤の製剤管理および有効性試験、安全性管理

研究分担者 松田 範昭 株式会社スリー・ディー・マトリックス事業開発部

研究要旨

microRNA-133a および microRNA-100 に対する阻害剤である S-TuD133a および S-TuD100 を用いた、骨肉腫のがん幹細胞を標的とした新規の治療薬剤の開発を目的とする。臨床適用を想定した動物モデルにおいて有効性と安全性を検証するため、皮下腫瘍作成後、切除モデルにおいて、S-TuD133a および S-TuD100 投与、その併用による転移抑制効果、延命効果を検証した。その際、シスプラチンの併用ならびに S-TuD の DDS として有用なペプチドキャリア A6K の併用による影響も含めて検証し、安全性試験の結果をふまえた臨床適用の至適投与量の設定を試みた。S-TuD100 および S-TuD133a とともに、単独にて microRNA 阻害効果の増強を認めたため、DDS を用いずとも、S-TuD 単独にて生体内で十分機能することが示唆された。両者の併用による効果の増強は、より長期間の延命効果の検証試験において確認する必要が示唆されたが、それにより、臨床に即した形での本剤の至適投与量の設定が可能となり、さらなる大型動物モデルでの前臨床試験、ヒトへの臨床試験への架け橋となることが期待できる。S-TuD133a および S-TuD100 の単独投与においては、毒性は見られず、シスプラチンとの併用においても毒性の増強は見られなかった。以上の結果から、本剤の臨床応用可能性が高まった。

A. 研究背景、目的
(背景)

がん幹細胞は、癌および肉腫の両者において、その発生・進展・転移・再発・治療抵抗性に深く関わっている。国立がん研究センターにて、骨肉腫「がん幹細胞」の細胞集団が特定され、その分画を阻害することで腫瘍の進展及び肺転移を抑制することが見出された。昨年度までの成果として、機能阻害のターゲットとして、microRNA-133a および microRNA-100 が特定されている。これらの microRNA に対する阻害剤として Synthetic Tough Decoy (S-TuD) を用いることで、動物モデルにて骨肉腫の腫瘍の進展および肺転移が抑制され、治療効果が期待された。S-TuD は共同研究者の伊庭らにより開発され、製品化における特許の問題が生じないだけでなく、従来の microRNA 阻害剤の問題(投与量が高用量となることや、DDS の必要性など)を解決できる可能性が高い。

本研究班では、当該阻害剤を新規の骨肉腫治療薬剤として開発するべく、動物試験に適合するスペックでの製造、動物安全性試験の実施などについて、その実行計画の策定および管理を行うことを目的とする。また、S-TuD133a と S-TuD100 を併用することで、骨

肉腫におけるがん幹細胞の阻害効果を相乗的に発揮させることを検証する。さらに、S-TuD を動物で用いるにあたり、DDS の必要性の有無を検証し、必要な場合は複合製剤としての薬剤開発、管理を行う。また、国立がん研究センターを含めた研究過程における知財戦略を策定し、効果的な特許出願を行っていく。

B. 研究方法

S-TuD133a および S-TuD100 生物学的安全性は、シスプラチンとの併用のもと、臨床想定投与量前後における反復投与試験で確認した。この臨床想定投与量は、マウス担癌モデルでの標的 miRNA のノックダウン効果および延命効果に基づいて設定している。ところが、実際の臨床においては、原発巣の腫瘍は外科的に切除することが常であり、その処置後の転移を如何に抑制するかが延命効果に直結すると考える。

そこで、マウスを用いた比較的大規模な群構成において、より臨床に近いと考えられる骨内腫瘍形成後、断脚モデルおよび、再現性の高い皮下腫瘍作成後、切除モデルにおいて、S-TuD133a および S-TuD100 投与による

転移抑制効果、延命効果を検証した。その際、シスプラチンの併用ならびにS-TuDのDDSとして有用なペプチドキャリアA6Kの併用による影響も含めて検証し、安全性試験の結果をふまえた臨床適用の至適投与量の設定を試みた。試験は、委託試験施設(株式会社新日本科学 安全性研究所)にて行った。

(倫理面への配慮)

動物を用いる実験においては「動物愛護管理法」、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛軽減に関する基準」、「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」、「厚生労働省の所轄する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」を踏まえ、各施設における動物取扱の取り決めを遵守して実施した。

C. 研究結果

はじめに骨内腫瘍形成後、断脚モデルを検討したが、手技の不安定性や処置時間の問題等から、比較可能な群数での実験モデルの作成に至らなかった。そこで、再現性の高いことが期待できる皮下腫瘍作成後、切除モデルに移行し、外科的処置後の転移検証モデルを確立した。S-TuD133a 単体、S-TuD100 単体、それらの組み合わせ、シスプラチンとの併用、A6Kキャリアの併用の群を設定して、8 週間の静脈内反復全身投与と試験を行った。

表 1 試験群構成

群	S-TuD133a (mg/mL)	S-TuD100 (mg/mL)	CDDP (mg/mL)	A6K (mg/mL)
1	-	-	-	-
2	-	-	0.5	-
3	0.1	-	-	-
4	0.1	-	0.5	-
5	0.1	-	0.5	1.7
6	1	-	-	-
7	1	-	0.5	-
8	-	0.1	-	-
9	-	0.1	0.5	-
10	-	0.1	0.5	1.7
11	0.1	0.1	-	-
12	0.1	0.1	0.5	-
13	0.1	0.1	0.5	3.4

0.1mg/kg の S-TuD100 または S-TuD133a の全身投与により、がん幹細胞分画の阻害性が見られた。両者の併用による効果の増強は、より長期間の延命効果の検証試験において確認する必要があると示唆された。転移抑制や延命効果に関しては、有意差が出た時点において、至適投与量の決定ができると考える。

DDS である A6K の添加による、腫瘍抑制効果の増強は確認されなかった。これは、S-TuD の臨床想定投与用量では、DDS 無しでも顕著な効果を認められたためであると考えられる。すなわち、S-TuD 単剤での全身での奏効性が確認されたといえる。

S-TuD 単独での毒性は、S-TuD133a および S-TuD100 の両者において見られなかった。シスプラチン併用群では、各検査においてシスプラチンの毒性と考えられる変化が散見されたが、S-TuD 併用投与による毒性の増強はみられなかった。

D. 考察

S-TuD100 および S-TuD133a ともに、単独にて microRNA 阻害効果の増強を認められたため、DDS を用いずとも、S-TuD 単体にて生体内で十分機能することが示唆された。両者の併用による効果の増強は、より長期間の延命効果の検証試験において確認する必要があると示唆されたが、それにより、臨床に即した形での本剤の至適投与量の設定が可能となり、さらなる大型動物モデルでの前臨床試験、ヒトへの臨床試験への架け橋となることが期待できる。S-TuD133a および S-TuD100 の単独投与においては、毒性は見られず、シスプラチンとの併用においても毒性の増強は見られなかった。以上の結果から、本剤の臨床応用可能性が高まった。

E. 結論

miR-133a ならびに miR-100 をターゲットとした、S-TuD133a、S-TuD100 による、骨肉腫がん幹細胞阻害効果と、安全性を確認した。未だ治療成績の低い骨肉腫の治療において、本剤は「がん幹細胞」に関連した miRNA をターゲットとした新規の骨肉腫治療薬剤として有望であると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

特になし

2. 学会発表

特になし

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

- 1) 国際特許出願 PCT/IB2012/002626、
MICRORNA-BASED METHODS AND
ASSAYS FOR OSTEOSARCOMA,
2012.9.7

日本移行 2014.3.6 (審査中)

米国移行 2014.4.9 (審査中)

欧州移行 2014.6.18 (審査中)

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

イヌ骨肉腫症例に対する抗 mir-133a 核酸製剤投与
研究分担者 伊藤 博 東京農工大学動物医療センター

研究要旨

今回臨床試験に用いたヒトの骨肉腫に発現している miR-133a の阻害剤は、犬にも発現が見られ、その有効性が期待でき、同時にその成果はヒト医療の発展にも繋がると予想される[20]。そこで今回我々は、イヌの骨肉腫における血清および腫瘍組織の miR-133a を検索し、その結果、イヌでもヒト同様にその発現が確認された。次いで、我々は犬での S-TuD の安全性試験を行い、その安全性を確認した。そこで今回、実際にイヌ骨肉腫における S-TuD の臨床的な有効性についての評価を行った結果、四肢に発症した骨肉腫は、抗がん剤単独治療に比較して肺転移の抑制が認められた。

A. 研究背景、目的
(背景)

現在の人医療あるいは獣医療での骨肉腫の治療は、外科的手術、放射線療法、および薬物療法(主として抗がん剤や分子標的治療薬)が主流となっている。他にも温熱療法、活性化リンパ球療法などの免疫療法、高濃度ビタミン C 点滴療法、代替療法(サプリメントやホメオパシーなど)、あるいは外科療法の併用としての動注療法などが行われている。このように様々な療法があり、また医療の発展により生存率は上昇したものの、ヒトで 5 年生存率が 50~70%、犬での 1 年生存率が 30~60%と、依然として根治を見込める安定した治療法は確立されていない[6,11]。イヌの骨肉腫は、イヌの骨原発性腫瘍の 80%程を占め、患部に強い疼痛を与え Quality of life を著しく損なう[20]。断脚などの侵襲性が高い外科手術を行ったとしても、発見時から早期に肺転移を起こす腫瘍であり、予後は非常に悪い[20]。前述の既存療法や検査では治療成績に限界があるため、新たな治療法や早期発見や予後、再発判定の為のマー

カーが求められている。

がんの根治を妨げている現代の最大の難問が、がん幹細胞である。がん幹細胞とはがん細胞のうち、自己複製能、多分化能といった幹細胞の特徴を持ち、かつ腫瘍形成能を持つ細胞のことであり、更には抗がん剤に対する抵抗性、転移能なども獲得すると考えられ、転移や再発の原因と考えられている[15]。手術による腫瘍の除去や、抗がん剤により分化したがん細胞を死滅させても、少数のがん幹細胞が残存していればがんは再発してしまう。腫瘍の根治を達成する為に、このがん幹細胞を標的とした療法が強く求められ、現在盛んに研究が進んでいる[15]。

近年、人医療では細胞内に発現している microRNA のコントロールを行う核酸医薬が注目を集めている。microRNA とは細胞内に存在する長さ 21~25 塩基長の 1 本鎖 RNA であり、遺伝子発現の抑制を担っている non-codingRNA である[7][12]。microRNA は標的 mRNA に対し不完全な相同性を以って結合し、機能を阻害するとともに翻訳抑制を行うこ

とでタンパク質産生を調節し、細胞の発生、分化、増殖、代謝、およびアポトーシスに深く関わっていることが分かっている[7]。また、細胞のがん化にも深く関与しているとされ、肝細胞がん、胃がん、すい臓がんなど様々な腫瘍で、特定の microRNA の発現の亢進や抑制が起こっていることが確認されており、転移や化学療法への感受性、ならびに予後の指標になりうる事が示唆されている[9]。更に、microRNA の発現を是正したり、機能阻害しつつ化学療法を併用したりする事で腫瘍が消滅した例も存在しており[3][17]、新しい腫瘍の治療法に繋がるとされ盛んに研究されている。また、microRNA はエクソソームなどのリポ蛋白質小胞に入り血液内に分泌される。ヒトの腫瘍では腫瘍細胞内で高次に発現している microRNA は、同時に血液内にも分泌される例があり、この性質を利用して診断や予後判定のための新たな腫瘍マーカーとしても期待されている[9]。

ヒトの骨肉腫の治療としての核酸医薬で注目を集めているのは microRNA -133a (miR-133a)である。miR-133a はヒトの骨肉腫細胞塊の約 10%の細胞内で発現が亢進している。in vitro ではヒト骨肉腫細胞株において、発現が低い細胞株への miR -133a の導入により浸潤能が亢進することや、逆に発現が亢進している細胞株への miR-133a の機能阻害により浸潤能が低下することが確認されている。更に miR-133a の発現が亢進している骨肉腫細胞は、自己複製能力と分化能を同時に有し、浮遊細胞塊形成能力を持つとともに薬剤抵抗性や、より強い浸

潤能を示すなど、がん幹細胞の特徴を持つことが判明しており microRNA ががん幹細胞の関連性が示唆されている。また、シスプラチンやドキシソルビシンの暴露によりヒト骨肉腫高転移株において miR-133a の発現が亢進することから、miR-133a の機能を阻害することにより、抗がん剤の有効性を高め、転移を抑制することが可能になるのではないかと期待されている[3]。

臨床的に核酸医薬を骨肉腫に用いる場合は、出来るだけ簡便な方法を用いて腫瘍細胞の miR-133a の機能阻害を行えることが望ましい。細胞内の microRNA の機能を阻害する方法としては locked nucleic acid (LNA)[19] や、antagomiRs[10]、などが既に存在するが、これらは細胞内に直接導入する必要がある上に、阻害活性は一時的である。また microRNA の競合阻害剤 microRNA sponge を発現する DNA ベクターも報告されているが[2]、これもプラスミドベクターにより細胞内に導入されたとしても、発現は短期間に留まる。つまり、仮に十分な量の microRNA 阻害剤を細胞内に導入できたとしても、代謝や細胞分裂により阻害性が減少してしまうという課題が存在する。その為、長期間にわたって、尚且つ高い microRNA 阻害活性を示す方法が望まれていた。

そこで、microRNA をより長期的に阻害する方法として、Tough Decoy RNA (TuD) が開発された[4]。これは microRNA と相補的な配列を持つ独特な 2 次構造をもつ一本鎖 RNA であり、レンチウイルスベクターを用いて細胞核

に導入された遺伝子が転写されることで発現する。TuD の有効性は非常に高く、標的 microRNA を 3 ヶ月以上もの長期にわたって機能阻害することが実証されている。しかしこの TuD もレンチウイルスを用いた細胞内導入を必要とする為、臨床に用いる際には技術や設備、倫理的問題など多くの問題があった[4]。

Synthetic TuD (S-TuD)はTuDを基に作られた RNA 様分子であり、1nM 以下の濃度でも十分な阻害活性があることが証明されている[5]。この濃度は標的腫瘍細胞が数回の細胞分裂をしても効果を発揮する濃度であり、また、細胞内での代謝を受けにくく、新たな核酸医薬として注目を浴びている。in vivo の実験で、マウスでの毒性試験およびルシフェラーゼ発現ヒト骨肉腫高転移株を移植したヌードマウスでの評価試験が行われており、シスプラチンとの併用により、肺転移抑制が確かめられ、実用性が非常に期待されている。更に、この試験での生体内投与の方法は S-TuD と抗がん剤の静脈投与であり、臨床的にも非常に扱いやすい[3]。

ヒトの骨肉腫とイヌのそれは発生年齢が若齢と中齢の二峰性の分布を取ることや、発生部位の病態が非常に似ていることから、腫瘍発生のメカニズムも類似していると考えられている[20]。今回臨床試験に用いた S-TuD はヒトの骨肉腫に発現している miR-133a の阻害剤であるが、上記の理由から犬での有効性も期待でき、同時にその成果はヒト医療の発展にも繋がると予想される[20]。そこで今回我々は、イヌの骨肉腫における血清お

よび腫瘍組織の miR-133a を検索し、その結果、イヌでもヒト同様にその発現が確認された。次いで、我々は犬での S-TuD の安全性試験を行い、その安全性を確認した。そこで今回、実際にイヌ骨肉腫における S-TuD の有効性についての評価を行ったので報告する。

B. 研究方法

【試供動物】

術前あるいは術後の病理検査で骨肉腫が確定診断された 8 症例(症例 A~D, F~I)と術前の病理検査にて骨肉腫が疑われた 1 症例(症例 E)を対象とした。

S-TuD を投与した骨肉腫症例は、付属骨格に発生したものが 4 例(大腿骨骨頸部 2 例、橈骨遠位部 1 例、上腕骨近位部 1 例)、軸性骨格に発生したものが 4 例(下顎 2 例、上顎 1 例、肋骨 1 例)であった。また、術前の病理検査で骨肉腫が疑われたが、術後病理検査で悪性間葉系腫瘍と診断された 1 例(左後肢)においても、S-TuD 臨床試験を行った。

術前に S-TuD を投与できた症例は 4 例あり、内訳は四肢に発生したものは 3 例、下顎に発生したものが 1 例であった。術後から投与を始めた症例は 5 例あり、内訳は四肢に発生したものは 2 例、下顎 1 例、上顎 1 例、そして肋骨 1 例であった(表 1、2)。

【手術】

原則的に完全切除を目的とした根治手術を行った。なお四肢に発生した場合、前肢は肩甲骨から、後肢は大腿骨頭から離断する断脚術を行った(表 3)。